

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-089897

(43)Date of publication of application : 04.04.1997

(51)Int.Cl.

GO1N 33/68

(21)Application number : 07-239597

(22)Date of filing : 19.09.1995

(71)Applicant : TAISHO PHARMACEUT CO LTD

(72)Inventor : ARIZONO KOJI
ARIYOSHI TOSHIHIKO
MIZUTANI TAKU
NAKAJIMA TOSHIAKI

(54) METHOD FOR SIMPLY EVALUATING ANTI STRESS EFFECT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To simply evaluate an anti stress effect, by measuring the formed amount of metallothionein in blood or internal organs by the formed amount of messenger ribonucleic acid (m-RNA) of metallothionein.

SOLUTION: In order to determine a minute amount of metallothionein in blood, etc., by the amount of protein, the metallothionein is not directly determined, but an m-RNA of the metallothionein related to protein is measured. That is, the m-RNA in blood or internal organs is amplified according to a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method, and a determined value of the obtained complementary DNA is converted thereby to obtain the formed amount of the m-RNA. An anti stress effect can be evaluated by obtaining/using the formed amount of metallothionein as an index from the formed amount of the m-RNA.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】実験動物の血液中および臓器中に誘導されるメタロチオネインの生成量を指標とすることを特徴とする抗ストレス効果の簡易評価法

【請求項2】血液中又は臓器中のメタロチオネインの生成量をメタロチオネインのメッセンジャーリボ核酸の生成量で測定することを特徴とする抗ストレス効果の簡易評価法

【請求項3】血液中又は臓器中のメッセンジャーリボ核酸の生成量をRT-PCR法により増幅して得られる相補的デオキシリボ核酸の定量値から換算することを特徴とする請求項1又は請求項2に記載の簡易評価法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗ストレス効果の簡易評価法に関し、更に詳しくは、血液、臓器中に誘導されるメタロチオネインの生成量を指標とすることを特徴とする抗ストレス効果の簡易評価法に関する。

【0002】

【従来技術】メタロチオネインはシステインを多く含む分子量約6500から7000の蛋白質で1分子中に7原子の金属を含む。この蛋白質はカドミウムや水銀など有害重金属の解毒、亜鉛や銅など生体必須金属の吸収、貯蔵、代謝に重要な役割を果たしていると考えられてきた。

【0003】しかし、近年になって、身体ストレスや拘束、電撃、拘束水浸、騒音、心理的な各種ストレスによってもメタロチオネインが誘導されることが解ってきた。メタロチオネイン以外のストレス関連生体内物質としては副腎皮質刺激ホルモン、グルココルチコイド、あるいはカテコールアミンがある。しかし、これらの物質は代謝されやすく、その濃度は一過性に変化するため、それらの物質の量的変化を追跡、検出する事は容易ではない。さらに副腎皮質ホルモンやグルココルチコイドは概日リズムによる日内変化が大きいなど、ストレス評価指標としては適当ではないと考えられる。メタロチオネインは概日リズムは認められず、ストレスの累積的評価指標として用いることが出来る（新岡 正、小島 豊、病態生理、11巻、9号、715頁、1992年）。

【0004】臓器中のメタロチオネインの定量法としてはメタロチオネインに結合している金属をHgやAgやCdと置換してこの金属量を原子吸光法で測定し、メタロチオネイン量に換算して求める方法（金属飽和法）やメタロチオネインに多く含まれるSH基を利用して測定する方法、さらにメタロチオネインの抗体を用いたラジオイミュノアッセイやエンザイムイミュノアッセイ法がある（佐藤政男ら、トキシコロジーフォーラム、第10巻、第4号、第348頁、1987年）。

【0005】金属飽和法の一つであるCd-ヘム法（小野坂ら、衛生化学、24巻、128頁、1978年）は

10

簡便で臓器中に比較的多量にメタロチオネインが生成する場合は便利な方法であるが、血液中などの微量なメタロチオネインを定量しようとする場合は抗体やラジオアイソトープを用いるしか方法がなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】抗ストレス効果を評価する方法として、金属結合蛋白質メタロチオネインを指標とすることはすでに提言されているが、臓器中に誘導されるメタロチオネインの量が少ないので血液中などの微量なメタロチオネインの生成量を測定することには問題があった。また、評価方法としては抗体やラジオアイソトープなどを使わないので簡便に測定する必要がある。

【0007】

【問題を解決するための手段】血液中などの微量なメタロチオネインを測定する場合はメタロチオネインを蛋白量として定量するのではなく、メタロチオネインのメッセンジャーリボ核酸（m-RNA）を測定すれば蛋白とm-RNAに相関があるので、抗ストレス効果をメタロチオネインを指標として評価できることに着目し、鋭意検討した結果、本発明を完成させた。

【0008】すなわち、本発明は、実験動物の血液中および臓器中に誘導されるメタロチオネインの生成量を指標とすることを特徴とする簡易微量定量法である。

【0009】本発明において、メタロチオネインの生成量を血液中又は臓器中のメタロチオネインのメッセンジャーリボ核酸の生成量で測定することが好ましく、更に、メッセンジャーリボ核酸の生成量が逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法により増幅して得られた相補的デオキシリボ核酸の定量値から換算して得ることが特に好ましい。

【0010】RT-PCR法とは、最近急速に普及したPCR（polymerase chain reaction）とリバーストランスクリプション（RT）と組み合わせて発現量の少ないmRNAの検出に用いられている方法である（牧野鈴子、実験医学、第9巻、第1401頁、1991年）。

【0011】以下に本発明の評価方法を詳しく述べる。まずマウスなどの実験動物の血液を採取し、その全血をイソゲンLS™（日本ジーン）で常法によりRNAを抽出する。

【0012】ステップ1：一本鎖cDNAの調製
抽出したRNA 2.0 μl (0.25 μg/2 μl) に下流プライマーとして antisense 5'-GGGTGGAACTGAATTAGGAGACGCTGG-3' 200 μMを0.25 μl 加え、緩衝液と精製水を加え全3.6 μl として反応液Aとした。次に、MnCl₂溶液0.5 μlとdATP, dGTP, dCTP, dTTPを各々0.1 μl及びリバーストランスクリプターゼを含むDNAポリメラーゼ0.5 μlを合わせて反応液Bとした。反応液Aにミネラルオイルを25 μl重層

20

50

し、70°C、5分間ブレインキュベートした。これを70°Cに保温したまま反応液Bを加え、70°Cで15分間インキュベートして一本鎖cDNAを調製した。

【0013】ステップ2：PCRによるcDNAの増幅
MgCl₂溶液2.0μl、上流プライマー(sense 5'-ATGGACCCAACTGCTCCTGCTCC ACC-3' 200μM) 0.25μl、キレート用緩衝液2.0μl及び精製水15.75μlを合わせてPCR緩衝液とした。

【0014】ステップ3：PCR操作

ステップ1の溶液にPCR緩衝液を加え、94°C、2分保持した後、94°C、30秒、55°C、30秒、72°C、1分30秒を5回繰り返す。次に、94°C、30秒、55°C、30秒、72°C、30秒を19~23回繰り返す。最後に72°C、7分加温してPCRを終了する。ミネラルオイルを除くために25μlのクロロホルムを加え軽く混合し12000 rpm、3分間、室温で遠心し、上清をPCR産物とする。

【0015】ステップ4：定量

PCR産物10μlをとりマーカーのプロムフェノールブルーと混ぜて2%アガローズゲルまたは8%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムプロマイド染色、及びビオチンラベルしたプライマーを使用したEC

L(アマシャム)発光を行う。定量はゲル写真またはX*

| 【表1】 実験群 | |
|----------|-----------------------|
| A群 | 室温+生理食塩水投与群 |
| B群 | 室温+滋養強壮保健剤投与群 |
| C群 | SARTストレス負荷+生理食塩水投与群 |
| D群 | SARTストレス負荷+滋養強壮保健剤投与群 |

【0022】表1中のストレス負荷系に関しては前述のように、電撃、拘束、寒冷、拘束水浸、騒音など色々あるが、滋養強壮保健剤の効果としては、慢性疲労のモデルとされている寒暖変化(Specific Alteration of rhythmic in Temperature, 以下SARTと略)ストレスを適用した(喜多ら、日薬理誌、71巻、195頁、1975年)。これは季節の変わり目での寒暖変化や冷房の効いたオフィスと暑い戸外の出入りを繰り返すことによる寒暖変化ストレスのモデルとしても考えられる。これは拘束や電撃などのストレスのように身体に直接負荷がかからないため、滋養強壮保健剤の評価におけるストレス負荷系として最適であると考えられる。

【0023】SARTストレス負荷方法は10時~17時は1時間毎に3°Cと24°Cの部屋を交替させ、17時~翌10時までは3°Cで飼育し、これをSARTストレス負荷1日として、計4日間SARTストレスを負荷した。

【0024】検体の滋養強壮保健剤は、50mg/10ml/kgを生理食塩水に懸濁させ、10ml/kgを1日1回4日間経口投与した。

*線フィルムをデンシトメーターを用いて行う。

【0016】

【発明の効果】後述する試験例から明らかのように、実験動物の血液中のメタロチオネインのm-RNA含量が肝臓中のm-RNA及びメタロチオネイン蛋白質の生成量と高い相関性を示すことから、メタロチオネインのm-RNAの測定が抗ストレス効果の評価法として簡便で優れた方法であることがわかった。

【0017】特に本発明により血液中のメタロチオネイン量を測定することが出来るようになり、実験動物に限らず、人から採取した血液中のメタロチオネインをも測定でき、人の抗ストレス効果を簡便に評価することが可能になった。

【0018】

【実施例】以下、試験例及び比較例に基づいて本発明をさらに詳細に説明する。

【0019】試験例

d d Y系雄性マウス(体重20g前後)を用い、1群6匹を用い以下の各群に分けた。

【0020】検体として、滋養強壮保健剤は生葉である刺五加と五味子及び各種ビタミンを含む固形の滋養強壮保健剤を用い、以下の表1に示すA~D群に分けた。

【0021】

【表1】 実験群

【0025】肝臓中のメタロチオネインの測定は前述の小野坂らの方法に準じて行った。マウスに最後の試料または生理食塩水投与24時間後に屠殺し、採血及び肝臓の摘出を行った。

【0026】肝臓約1gを精密に秤量し、氷水中で冷却しておいた5mlの蔗糖溶液(0.25M)の入った試験管に入れた。冷やしながらホモジナイズした後、5°Cで15000 rpm、20分間遠心し、予め別の試験管にトリス塩酸緩衝液(30mM, pH8.0)1.9ml

40 1とトリス緩衝液で10ppmの濃度に調整したカドミウム溶液1mlの混液に遠心後の上清0.5mlを加え攪拌した。5分間放置後、2%ヘモグロビントリス緩衝液0.2mlを加え、攪拌後沸騰した水浴に試験管を1分間漬けた。試験管を取り出し、4°Cで3000 rpm、5分間遠心した後、上清を2%ヘモグロビントリス緩衝液0.2mlの入った試験管に移し、再度沸騰した水浴に入れ、上記と同様の操作を行い、これをもう一度繰り返した。最後に遠心した上清を別の試験管に移した。

50 【0027】この試料を用い、原子吸光光度計(日立Z

8100)でカドミウムの含量を測定し、メタロチオネイン量に換算した。

【0028】血液中メタロチオネインのmRNAは前述の方法で定量した。

* [0029]結果を表2に示した。

[0030]

【表2】測定値

*

| | 血液中の mRNA | 肝臓中の mRNA | 肝臓中の メタロチオネイン ng/mg蛋白±SE |
|----|--------------|--------------|--------------------------------|
| A群 | 100 | 100 | 28.1±0.9 |
| B群 | 108±15 | 105±16 | 25.4±3.6 |
| C群 | 210±22 | 230±27 | 64.3±3.2 |
| D群 | 128±18 | 90±19 | 30.2±2.7 |

[0031] * : $p < 0.05$

但し、mRNAについてはA群の測定値を100とし3回くりかえした時の平均値とSEである。

【0032】SARTストレス負荷で生理食塩水投与群(C群)ではA群に比べ有意に肝臓中メタロチオネイン量が増加し、大きなストレスを受けていることが解る。

※意にメタロチオネインの誘導を抑制し、抗ストレス効果があることを示している。

【0033】また、肝臓中及び血液中のメタロチオネインmRNAも肝臓中の蛋白レベルと同様の傾向を示し、mRNAの測定が、滋養強壮保健剤の抗ストレス効果を評価する際の簡便で優れた方法であることを示している。

フロントページの続き

(72)発明者 中島 俊明

東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製
薬株式会社内